

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 103 19 155.0  
Anmeldetag: 29. April 2003  
Anmelder/Inhaber: Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen/DE  
Bezeichnung: Elektrisch auslesbare Bindungen von Analytmolekülen an immobilisierten Sondenmolekülen  
IPC: G 01 N 33/50

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 04. März 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "B. Brödig".



## **Elektrisch auslesbare Bindungen von Analytmolekülen an immobilisierten Sondenmolekülen**

Die Erfindung bezieht sich auf den Nachweis der Bindungen von Analytmolekülen, beispielsweise Biopolyermolekülen, an immobilisierten Fängersubstanzmolekülen.

- 5 Die Erfindung besteht darin, Halbleiter-Platten (Chips) mit elektrischen Schaltkreisen in räumlicher Nähe zur Oberflächenbelegung mit Fängersubstanzmolekülen zu verwenden, und die Bindungen der Analytmoleküle an den Fängersubstanzmolekülen durch mitgebundene elektrisch leitfähige Nanopartikel zu belasten, so dass die Nanopartikel durch Änderungen der elektrischen Umgebungskapazität oder durch Erzeugung von elektrochemischen Spannungen 10 auf die elektrischen Schaltkreise einwirken können und somit die Bindungen der Analytmoleküle elektronisch nachweisbar werden.

### **Stand der Technik**

- Es handelt sich hier um das weite Feld der so genannten Chiparrays mit kovalent gebundenen Fängersubstanzmolekülen für den Nachweis affin bindender Biopolyermoleküle. Die auf 15 den Arrayfeldern gebundenen Fängersubstanzmoleküle können DNA-Moleküle („DNA-Chips“), Proteinmoleküle („Proteinchips“) oder sonst geartete Moleküle mit affiner Bindungsfähigkeit sein. Im Folgenden werden die Biopolyermoleküle als „Analytmoleküle“, die Fängersubstanzmoleküle auf den Chipfeldern einfach als „Sondenmoleküle“ bezeichnet. Die hybride oder affine Bindung der Analytmoleküle an den Sondenmolekülen findet aus Lösungen heraus statt, in denen die gesuchten Analytmoleküle vorkommen können, wobei die 20 Lösungen mit der belegten Chipoberfläche in direktem Kontakt stehen.

- Diese Chiparrays mit Sondenmolekülen werden für das Studium der Bindungen (beispielsweise Kreuzreaktionen bei Antikörper-Bindungen), besonders aber für das selektive Einfangen von Analytmolekülen aus Körperflüssigkeiten und damit für die qualitative und quantitative Analyse dieser Analytmoleküle selbst verwendet. In einigen Fällen, beispielsweise für den Nachweis kennzeichnender DNA-Stränge von Infektionserregern, grenzen sich die Analysen 25 auf eine einfache Aussage über Anwesenheit oder Abwesenheit des Infektionserregers ein. Durch die Vielzahl von Sondenfeldern auf den Chiparrays kann eine Probe mit Körperflüssigkeit gleichzeitig auf die Anwesenheit eines oder mehrerer unter sehr vielen verschiedenen 30 Arten von Infektionserregern nachgewiesen werden.

Die Analysenverfahren mit solchen Chiparrays werden auch als „zellenbasierte Assays“ bezeichnet (cell-based assays); die Verfahren selbst häufig als „Screening“.

- Die Chiparrays können aus Halbleitermaterial, wie beispielsweise aus Siliziumwafern, gefertigt sein, aber es sind auch beliebige andere plattenförmigen Materialien als Grundlage 35 für die Belegung mit Sondenmolekülen möglich. Es können dazu verschiedenartige Gläser,

Metalle und sogar Kunststoffe verwendet werden. Halbleiter haben den Vorteil, dass sich in ihnen auch mit mikrofabrikatorischen Verfahren elektrische Schaltkreise einbringen lassen.

Als Stand der Technik haben sich bisher für den Nachweis der Bindung von Analytmolekülen an Sondenmolekülen nur wenige Verfahren eingeführt, die hier nur sehr kurz dargelegt werden.

Ein Nachweis der Bindungen ist beispielsweise durch zusätzlich an die Analytmoleküle angebundene Fluoreszenzfarbstoffe möglich; ein solches Verfahren erfordert Laserscanner oder Fluoreszenzmikroskope. Diese Geräte sind jedoch kompliziert und teuer; die dafür geeigneten (patentierten) Fluoreszenzfarbstoffe sind ebenfalls teuer.

10 Ein massenspektrischer Nachweis der affin gebundenen Analytmoleküle, beispielsweise mit einer Ionisierung durch matrixunterstützte Laserdesorption (MALDI) nach Zugabe entsprechender Matrixsubstanzen, ist wegen des dazu benötigten Massenspektrometers ebenfalls recht aufwendig. Der massenspektrometrische Nachweis hat allerdings den Vorteil, eine zusätzliche Bestätigung der Identität der Analytmoleküle durch ihre Masse zu liefern.

15 Ein weiteres Verfahren, das zur Zeit in Entwicklung ist, besteht auf der gleichzeitigen Anbindung der Analytmoleküle und größerer Massen, beispielsweise durch Nanopartikel, auf geeigneten Schwingern für einen Nachweis der affinen Bindungen durch akustische Oberflächenwellen (SAW = surface acoustic waves), deren Frequenz belegungsabhängig ist.

Das Verfahren der Plasmonresonanzspektrometrie, das ebenfalls zum Nachweis der affinen 20 Bindungen von Analytmolekülen an Sondenmolekülen verwendet wird, bedarf jeweils etwas größerer Flächen für die flache Reflektion des Lichts, so dass es bisher nicht gelungen ist, für diese Art des Nachweises Arrays mit größeren Anzahlen an Feldern zu produzieren. Die Vorteile liegen darin, auch die Kinetik des Bindevorgangs messen zu können.

25 Der Verwendung von Chiparrays, die gleichzeitig die Anwesenheit oder Abwesenheit von hunderten oder tausenden von verschiedenartigen Analytsubstanzen durch Belegung mit verschiedenenartigen Sondenmolekülen nachweisen können, wird eine große Zukunft vorausgesagt. Die bisherigen Leseverfahren sind aber noch zu kompliziert. Es besteht daher Bedarf für ein einfaches Verfahren der möglichst direkten Auslesbarkeit von Bindungen der Analytmoleküle. Eine einfache Auslesemöglichkeit für affine Bindungen wäre aber nicht nur für Chip-arrays mit vielen Feldern interessant, sondern auch für einzelne Felder, die beispielsweise 30 nacheinander mit verschiedenartigen Liganden beschickt werden können.

#### Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zu finden, durch das sich eine Bindung von Analytmolekülen an immobilisierten Sondenmolekülen auf einem Chip in einfacher und preiswerter Weise und mit hoher Empfindlichkeit direkt als elektrisches Signal auslesen lässt.

### Kurze Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf den Oberbegriff des Anspruchs 1 und besteht in dem Verfahren, dass durch den kennzeichnenden Teil des Anspruchs 1 gegeben ist. Günstige Ausführungsformen sind durch die weiteren Ansprüche gegeben.

5 Es ist der Kerngedanke der Erfindung, zusammen mit den Analytsubstanzen in an sich bekannter Weise elektrisch leitfähige Nanopartikel an die oberflächengebundenen Sondenmoleküle anzubinden, wobei die Nanopartikel durch eine Veränderung der Umgebungskapazität oder durch eine Stromerzeugung, letzteres nach Herstellung eines elektrischen Kontakts, auf räumlich nahe elektronische Schaltkreise einwirken und so die Bindung messbar machen. Die 10 elektronischen Schaltkreise sind bevorzugt in Halbleiteroberflächen eingearbeitet, sie werden im Folgenden als „Schaltkreisoberflächen“ bezeichnet.

Die Sondenmoleküle können sich auf der Schaltkreisoberfläche selbst befinden, sie können sich aber auch auf einer Oberfläche eines beliebigen Körpers befinden, der der Halbleiteroberfläche gegenübersteht. Diese Oberfläche werde im Folgenden mit „Gegenfläche“ bezeichnet.

15 Die beiden Oberflächen, Schaltkreisoberfläche und Gegenfläche, sind dabei bevorzugt eben und planparallel zueinander ausgebildet.

Die Nanopartikel sollen elektrisch leitend sein, beispielsweise durch einen metallischen Kern oder durch eine metallische Oberfläche. Die Nanopartikel können dann auf elektrische Weise (also nicht mechanisch, wie bei akustischen Oberflächenwellen) auf die elektrischen Schaltkreise der Schaltkreisoberfläche eine Wirkung ausüben. Durch diese Einwirkung können die 20 Bindungen von analytischen Molekülen an die Sondenmoleküle durch eine Veränderung im Verhalten der Schaltkreise auslesbar werden. Die elektrische Einwirkung der Nanopartikel auf die Schaltkreise kann kapazitiv oder durch Stromerzeugung geschehen, wobei im letzteren Fall der Stromfluss nach Herstellung eines Kontaktes durch eine elektrochemisch erzeugte Spannung an den Nanopartikeln gegenüber der Schaltkreisoberfläche gespeist wird.

25 Dabei können die Nanopartikel einerseits bereits an die Analytsubstanzen gebunden sein. – Andererseits ist es aber vorteilhaft, in einem ersten Schritt erst die Analytmoleküle an die Sondenmoleküle zu binden, und dann in einem zweiten Schritt die Nanopartikel, die ebenfalls mit Fängersubstanzen belegt sind, über eine zweite affine Bindung an die jetzt immobilisierten Analytsubstanzen zu binden. Diese Fängermoleküle auf den Nanopartikeln werden zur 30 Wahrung der Eindeutigkeit im Folgenden als „Haftmoleküle“ bezeichnet. Dieses Mehrschritt-Verfahren kann im zweiten Schritt durch weitere Zugabe von Flüssigkeit, die die mit Haftmolekülen belegten Nanopartikel enthält, oder auch durch Austausch der Flüssigkeiten durchgeführt werden. Für die Messung kann es zweckmäßig sein, in einem dritten Schritt die unbundenen Nanopartikel durch Austausch der Flüssigkeiten wieder zu entfernen.

35 Die leitfähigen Nanopartikel beeinflussen, entweder in der Flüssigkeit oder im Zustand nach dem Trocknen, die elektrische Umgebungskapazität an den Schaltkreisen und bewirken so

eine messbare Änderung des elektrischen Schaltverhaltens. Da die Flüssigkeit als Elektrolyt stets eine gewisse Leitfähigkeit besitzt, kann die Veränderung der Kapazität in der Flüssigkeit nur mit genügend hoher Frequenz gemessen werden, da dann die freie Beweglichkeit der Ionen in der Flüssigkeit durch die begrenzte Ionenmobilität eingeschränkt ist, während der

5 Elektronenstrom im Nanopartikel praktisch ungehindert ohne Trägheit fließen kann.

Es können die Nanopartikel aber auch mit einem edlen Metall wie beispielsweise Silber metallisiert sein; sie bilden mit zugeführter Elektrolytflüssigkeit, die etwas lösliches Silbersalz enthält, und mit einer Gegenelektrode aus einem unedleren Metall wie beispielsweise Zink auf einem Teil der Schaltkreisoberfläche ein galvanisches Element, das ein Potential zwischen

10 Nanopartikel und Gegenelektrode auf der Schaltkreisoberfläche aufbaut. Um einen Strom in der Schaltkreisoberfläche fließen zu lassen, ist es notwendig, die Nanopartikel mit der Schaltkreisoberfläche in elektrisch leitenden Kontakt zu bringen.

Ist beispielsweise der Kern des Nanopartikels magnetisierbar, so kann das Nanopartikel durch eine magnetische Kraft kontaktierend an die Schaltkreisoberfläche (abseits der Gegenelektrode) gedrückt werden. Es fließt dann ein Strom durch die Schaltkreisoberfläche zur Gegen-

15 elektrode, welcher auf die Schaltkreise der Schaltkreisoberfläche einwirken kann, beispielsweise auf die Steuergitter von Feldeffekt-Transistoren.

Es können aber auch elektronenleitende Kettenmoleküle zwischen Schaltkreisoberfläche und Nanopartikel angeordnet werden, beispielsweise durch Anbindung langer, einseitig kovalent

20 angebundener Polyacetylenketten (ein Polyen) zwischen den Sondenmolekülen, so dass das Spannungspotential der Nanopartikel direkt durch die elektronenleitenden Moleküle auf das Steuergitter eines Feldeffekt-Transistors einwirkt. Diese Art der Einwirkung ist sehr empfindlich, bereits ein einziges gebundenes Nanopartikel kann eine messbare Wirkung erzeugen.

Befinden sich die Sondenmoleküle auf einer der Schaltkreisoberfläche gegenüberliegenden Körperoberfläche, der Gegenfläche, so kann auch die gesamte Gegenfläche auf die Schaltkreisoberfläche gedrückt werden, um die Kontakte der Schaltkreisoberfläche mit den Nanopartikeln herzustellen. In diesem Fall sollte die Gegenfläche mit den Sondenfeldern bevorzugt aus einem isolierenden Material bestehen, oder es sollten zumindest die leitenden Unterlagen der Sondenfelder voneinander isoliert sein.

30 Im Falle des Nachweises von bestimmten DNA-Sequenzen in der Analytflüssigkeit kann auch eine PCR-Reaktion vorgeschaltet werden. Diese kann auch in einer Kammer stattfinden, deren eine Wand durch die Schaltkreisoberfläche gebildet wird. Die andere Wand kann eine Wand aus Glas oder Halbleiter sein, in die entsprechende Heizelemente für die Heizzyklen der PCR-Reaktion integriert sind. Die PCR-Reaktion kann beispielsweise im ersten Schritt von

35 Mehrschritt-Verfahren integriert sein.

Über einen magnetisierbaren Kern werden die Nanopartikel („magnetic beads“) durch äußere Magnetfelder manipulierbar. Sie lassen sich beispielsweise von den Sondenfeldern abziehen, wenn es sich um reine adhäsive Bindungen handelt, und nicht um affine Bindungen der Haftmoleküle mit deutlich höheren Bindungsenergien. Auch lässt sich die Flüssigkeit mit den

- 5 Nanopartikeln mit magnetischen Wirbelfeldern umrühren, um die extrem langsame Diffusionsbewegung der Nanopartikel, die zu extrem langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten der affinen Bindungen zu den immobilisierten Analytmolekülen führt, durch wie auch immer geartete Wirbelströme in der Flüssigkeit zu unterstützen.

#### *Kurze Beschreibung der Abbildungen*

- 10 Abbildung 1 zeigt die indirekte Anbindung eines Nanopartikels 7 an eine Oberfläche 1.

Links: Über eine flexible Brücke 2 ist eine DNA-Sonde 3 an die Oberfläche 1 kovalent angebunden. Ein Analytmolekül 4 bindet durch Hybridisierung an die DNA-Sonde 3. Das Nanopartikel 7 trägt über eine flexible Brücke 6 das Haftmolekül 5, das benachbart zur Sonde 3 an das Analytmolekül 4 bindet.

- 15 Rechts: Hier ist das Nanopartikel 7, das mit Streptavidin 10 belegt ist, an die Biotin-Gruppe 9 des Analytmoleküls 8 gebunden. Das Analytmolekül 8 wird in einem vorausgehenden Schritt während der PCR-Vervielfältigung durch biotinylierte Primer mit der Biotin-Gruppe 9 versehen.

- 20 Abbildung 2 zeigt links die Anbindung von Nanopartikeln 14 über Analyt- und Sondenmoleküle 15 an eine Gegenfläche 16, die sich gegenüber einer Schaltkreisfläche 11 mit einer Gegenelektrode 12 und einer Kontaktstelle 13 befindet. Rechts ist die Kontaktierung durch Andrücken der Gegenfläche 16 an die Schaltkreisfläche 11 gezeigt.

#### *Besonders günstige Ausführungsformen*

- 25 Die Erfindung besteht darin, zusammen mit den Analytmolekülen auch elektrisch leitfähige Nanopartikel an die Sondenmoleküle anzubinden, und die Nanopartikel durch Stromerzeugung oder Kapazitätsänderung elektrische Wirkungen auf nahebei angeordnete elektrische Schaltkreise ausüben zu lassen. Die Nanopartikel können Durchmesser im Bereich von etwa 20 Nanometer bis etwa 10 Mikrometer haben; in Einzelfällen auch darüber oder darunter. Als Grundlage für die Schaltkreise werden üblicherweise Siliziumwafer verwendet, in die die Schaltkreise mit üblichen mikrofabrikatorischen Verfahren wie beispielsweise Ionenimplantation und Ionenätzen, aber auch durch maskengesteuerte Manipulationen, eingearbeitet sind. Die Nanopartikel üben kapazitiv oder stromerzeugend (nach Aufbau von elektrochemischen Spannungen und Kontaktierung) elektrische Wirkung auf die elektronischen Schaltkreise aus, wodurch die Bindungen von analytischen Molekülen über die mitangebundenen Nanopartikel 30 durch eine Veränderung im Steuerverhalten der Schaltkreise messbar und daher einfach 35 auslesbar werden.

Es soll hier noch einmal die hier verwendete Nomenklatur dargelegt werden: Die Zielmoleküle, beispielsweise Biopolymere, deren Bindung an oberflächengebundene Fänger moleküle gemessen werden sollen, werden hier als „Analytmoleküle“ bezeichnet. Die oberflächengebundenen Fänger moleküle heißen hier „Sondenmoleküle“ – zur Unterscheidung von den 5 Fänger molekülen auf den Nanopartikeln. Eine Fläche, die mit gleichartigen Sondenmolekülen belegt ist, heißt ein „Sondenfeld“. Die Sondenfelder können sich auf der „Schaltkreisoberfläche“ oder aber auf einer der Schaltkreisoberfläche gegenüberstehenden „Gegenfläche“ befinden. Die Fänger moleküle auf den Nanopartikeln, die in Mehrschritt-Verfahren gebraucht werden, werden hier zur Unterscheidung als „Haftmoleküle“ bezeichnet, obwohl es sich um 10 Fänger moleküle mit gleichen Funktionen wie die Sondenmoleküle handeln kann.

Unter „kovalenten Bindungen“ verstehen wir hier wie üblich die Hauptvalenzbindungen (80 bis 550 kJ/mol), während wir unter „affinen Bindungen“ die Nebenvalenzbindungen (8 bis 20 kJ/mol, Assoziationen, Dipol-Dipol-Bindungen, van-der-Waals-Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen u. dergl.) verstehen. Es werden mit den hier geschilderten Verfahren in der 15 Regel die affinen Bindungen von Analytmolekülen zu kovalent angebundenen Sondenmoleküle auf Sondenfeldern gemessen. Die affinen Bindungen sind in der Regel leicht zu reversieren, so dass eine mehrfache Benutzung der Sondenfelder möglich wird.

Es werde hier zunächst dargelegt, wie die Nanopartikel im physikalisch-chemischen Teil des Verfahrens in an sich bereits bekannter Weise zusammen mit den affin bindenden Analytmolekülen an Oberflächen in räumlicher Nähe zur Schaltkreisoberfläche gebunden werden, danach wird beschrieben, wie die Nanopartikel auf die Schaltkreise elektrisch einwirken können, um im elektronisch messenden Teil des Verfahrens die Lesbarkeit der affinen 20 Bindungen zu bewirken.

Es können die Analytsubstanzen bereits an die Nanopartikel gebunden sein, bevor sie mit den Sondenmolekülen reagieren. 25

Hier ein Beispiel, das die Untersuchung des Bindungsverhaltens eines als Target untersuchten Proteinmoleküls zum Ziel hat: Für Tests mit Hunderten von einschlägigen Ligandentypen aus Bibliotheken können die Liganden bereits alle an Nanopartikel angebunden sein. Die Liganden können beispielsweise einem elektronischen Chip mit direkt kovalent angebundenen 30 Targetmolekülen, die hier als Sondenmoleküle fungieren, zeitlich nacheinander zugeführt werden. Es folgt dann jeweils die Messung einer eventuellen Bindung der Liganden. Da die Bindung der Liganden nicht kovalent, sondern nur reversibel affin ist, können die Liganden danach wieder abgelöst werden. Die Chipoberfläche ist dann frei für den Test des nächsten Liganden. Dieser Test kann leicht automatisiert werden.

35 Für Schaltkreisoberflächen (oder gegenüberstehenden Gegenflächen) mit vielen Sondenfeldern, die mit unterschiedlichen Sondenmolekülen belegt sind, erscheint es vorteilhaft, ein Mehrschritt-Verfahren anzuwenden. In einem ersten Schritt werden die Analytsubstanzen an

die Sondensubstanzen gebunden, und in einem zweiten Schritt werden die Nanopartikel, die mit Haftmolekülen belegt sind, über eine zweite affine Bindung an die jetzt immobilisierten Analytsubstanzen gebunden. Dieses Mehrschritt-Verfahren kann nach dem ersten Schritt durch weitere Zugabe von Flüssigkeit, die die Nanopartikel enthält, oder auch durch Austausch der Flüssigkeiten durchgeführt werden. Für die Messung ist es in der Regel zweckmäßig, in einem dritten Schritt die ungebundenen Nanopartikel durch Austausch der Flüssigkeiten und entsprechendes Waschen wieder zu entfernen. Es kann sich in einem vierten Schritt auch ein partielles oder vollständiges Trocknen anschließen.

Hier ein Beispiel für ein Mehrschritt-Verfahren, das sich auf den Nachweis von DNA-

Hybridisierungen bezieht: Auf den Sondenfeldern können als Sondenmoleküle DNA-Stränge kovalent gebunden sein (nicht nur hier, sondern auch in der Literatur häufig als „Sonden“ bezeichnet), die entsprechende Gegenstränge analytischer DNA aus der Analytlösung binden. Eine solche Sonde befindet sich für gewöhnlich auf einem flexiblen Stiel aus einem Polymermolekül, das einerseits an der festen Oberfläche, andererseits an der DNA-Sonde kovalent gebunden ist. Dieser Aufbau erleichtert die Hybridisierung des gegensträngigen Analytmoleküls aus der Analytflüssigkeit. Zum Hybridisieren wird eine optimale Temperatur eingestellt, die einerseits die Diffusion der Analytmoleküle erleichtert, und andererseits gerade noch die Hybridisierung mit den richtigen Gegensträngen ermöglicht, um Hybridisierungen mit solchen Gegensträngen, die in ihrer Sequenz nicht vollkommen der Sequenz der Sonden entsprechen, also Fehlstellen enthalten, zu vermeiden. Nach der Hybridisierung wird die Analytlösung mit einer Lösung ausgetauscht, die die Nanopartikel enthält. Auf diesen Nanopartikeln sind, wiederum über flexible Brückenpolymere, als Haftmoleküle kovalent DNA-Stränge angebunden, die benachbart zu den DNA-Sonden auf den jetzt immobilisierten DNA-Analytmolekülen hybridisieren. Wegen der langsamen Diffusion der Nanopartikel muss mit einer längeren Zeit für die Hybridisierung gerechnet werden, wobei durch vorsichtiges Umrühren eine Beschleunigung des Vorgangs erzielt werden kann. Durch den Vorgang der doppelten Hybridisierung werden die Nanopartikel indirekt an die Chipoberfläche gebunden. Dieses Verfahren ist im Prinzip bekannt.

Das Verfahren kann insbesondere für eine Spezies-Erkennung für Tiere, Pflanzen oder Mikroorganismen verwendet werden. Die gesuchte Spezies wird dabei dadurch bestimmt, dass charakteristische Sequenzen ihrer DNA (oder RNA) als Sondensequenzen auf der Sondenfeldern und als Haftsubstanzsequenzen auf den Nanopartikeln verwendet werden. Es können so beispielsweise Infektions-Erreger erkannt werden. Es kann festgestellt werden, ob das Fleisch in einer Wurst von Rind, Pferd, Esel, Giraffe oder Känguru stammt. Auch gentechnische Veränderungen von Pflanzen oder Tieren können festgestellt werden, wenn die Sequenzen der Veränderungen bekannt sind.

Die Isolierung und Aufbereitung der DNA für solche Analysen ist bekannt. Um die Diffusion der sehr langen DNA-Stränge und die Dehybridisierung der DNA-Doppelstränge vor der Analyse zu erleichtern, kann die DNA durch entsprechende Enzyme (Endonukleasen) in kürzere Stränge verdaut werden. Andererseits können geeignete Abschnitte der DNA durch

- 5 Polymerase Chain Reactions (PCR) vermehrt werden, bevor sie der Analyse durch die Chips zugeführt werden.

Bei PCR-amplifizierter DNA können die zur Vervielfachung verwendeten Primer auch einseitig mit Biotingruppen abgeschlossen werden (bei der Herstellung der Primeroligos werden die Primer meist über eine Biotin-Bindung immobilisiert, so dass bei einer Bestellung

- 10 von biotinylierten Primern keine zusätzlichen Kosten anfallen). Das Biotin geht mit den Primern endständig in die vervielfachten Analytmoleküle ein. Nach der Hybridisierung der Analytmoleküle an den Sondenmolekülen auf dem Chip können dann Nanopartikel zugegeben werden, die in bekannter Weise mit Streptavidin in kovalenter Bindung zur Nanopartikeloberfläche belegt sind. Da Streptavidin sofort mit den Biotingruppen bindet, werden so die 15 Nanopartikel indirekt an die Chipoberfläche gebunden. Statt des bekannten Bindungspaares Biotin-Streptavidin können selbstredend auch beliebige andere Bindungspaire verwendet werden.

Ein anderes Beispiel für ein Mehrschritt-Verfahren bezieht sich auf den Nachweis bestimmter Proteine in der Analytflüssigkeit. Dabei wird von Antikörpern Gebrauch gemacht, die

- 20 spezifisch bestimmte Proteine über so genannte „Bindungsmotive“ auf der Oberfläche affin binden. Auf den Sondenfeldern sind als Sondenmoleküle in diesem Verfahren Antikörper gebunden, die aus der Analytflüssigkeit alle Proteine binden, die ein entsprechendes Bindungsmotiv besitzen. Die dann im nächsten Schritt zugegebenen Nanopartikel haben als Haftmoleküle ebenfalls Antikörper gebunden, die aber an ein gegenständiges, zweites Bindungsmotiv der bereits gebundenen Proteine binden. Zweckmäßigerweise sind die 25 Antikörper, die als Haftmoleküle auf den Nanopartikeln sitzen, weniger spezifisch und selektiv und binden an einer großen Anzahl von Proteinen, jedoch nicht auf den als Sondenmolekülen aufgebrachten Antikörpern. Auch hier werden die Nanopartikel indirekt an die Oberfläche der Sondenfelder gebunden.

- 30 Auch in diesem Fall der Proteine kann, wenn gewünscht, durch eine zweifach selektive Bindung mit selektiven Sondenmolekülen und selektiven Haftmolekülen eine außerordentlich starke Selektivität und damit ein sehr sicherer Nachweis des gesuchten Analytproteins erzeugt werden.

Die Nanopartikel können insbesondere auch einen magnetisierbaren Kern enthalten („magnetic beads“); sie werden dadurch durch äußere Magnetfelder manipulierbar. Die Nanopartikel

- 35 lassen sich beispielsweise durch stark inhomogene Magnetfelder von den Sondenfeldern abziehen, wenn es sich um rein adhäsives Haften handelt und nicht um affine Bindungen mit

deutlich höheren Bindungsenergien. Damit kann das Waschen der Sondenfelder und Wegspülen nichtgebundener Nanopartikel unterstützt werden. Auch lässt sich die Flüssigkeit mit den Nanopartikeln mit magnetischen Wirbelfeldern umrühren, um die extrem langsame Diffusionsbewegung der Nanopartikel, die zu extrem langsamen Reaktionsgeschwindigkeiten der affinen Bindungen zu den immobilisierten Analytmolekülen führt, durch wie auch immer geartete magnetische Wirbelströme in der Flüssigkeit zu unterstützen. Die Nanopartikel können auch an einer gegenüberliegenden Wand gesammelt werden, wenn beispielsweise die Flüssigkeit ausgetauscht werden soll, ohne die Nanopartikel zu verlieren.

Die nunmehr durch die indirekte Bindung an der Oberfläche der Sondenfelder immobilisierten Nanopartikel können in verschiedenartiger Weise auf nahebei liegenden Schaltkreise einwirken: durch Veränderung der Umgebungskapazität oder durch den Aufbau von Potentialdifferenzen. Auf die bereits bekannte mechanische Einwirkung durch Veränderung der Frequenz von akustischen Oberflächenwellen wird hier nicht eingegangen.

Die leitfähigen Nanopartikel beeinflussen sowohl in der Flüssigkeit wie auch im Zustand nach dem Trocknen die elektrische Umgebungskapazität an den Schaltkreisen und können so eine messbare Änderung des elektrischen Schaltverhaltens bewirken. Die Nanopartikel wirken im getrockneten Zustand wie kleine Zusatzkondensatoren an den Schaltkreisen. Deren Wirkung kann beispielsweise durch die Verstimmung von Hochfrequenzkreisen gemessen werden. Die Zusatzkapazität kann insbesondere dann eine starke Rolle spielen, wenn einer ebenen Halbleiteroberfläche mit Schaltkreisen eine andere ebene Oberfläche als Gegenelektrode (die nicht mit der oben definierten, Sondenfelder enthaltenden Gegenfläche identisch sein muss) relativ nahe gegenübersteht, und die Nanopartikel zwischen Halbleiter und Gegenelektrode eine Veränderung der Schaltkreiskapazitäten und damit eine starke Verstimmung der Hochfrequenzkreise erzeugen. Halbleiteroberfläche und Gegenelektrode können dabei zwei planparallele Wände eines spaltenförmigen Gefäßes bilden, das zunächst die Analytflüssigkeit, später die Nanopartikelflüssigkeit, dann die Waschflüssigkeit und zuletzt das Trocknungsgas aufnimmt.

Aber auch in der Flüssigkeit lassen sich die Nanopartikel durch die Veränderung der Umgebungskapazität messen. Dazu ist allerdings eine genügend hohe Prüffrequenz erforderlich, da bei geringen Frequenzen die Messung durch den Ionenfluss in der Flüssigkeit so gestört wird, dass die Zusatzkapazität nicht erkannt werden kann. Erst bei genügend hohen Frequenzen ist der Ionenstrom durch die begrenzte Mobilität der Ionen in der Flüssigkeit so behindert, dass die Zusatzkapazität durch die Nanopartikel mit den in ihr fast unbehindert fließenden Elektronenströmen durch ihre Wirkung auf die Schaltkreise erkannt werden kann.

Es kann mit den Nanopartikeln aber auch eine elektrochemische Zelle (ein galvanisches Element) aufgebaut werden, deren Spannung nach Kontaktierung auf die Schaltungen des Chips einwirkt. Dazu können die Nanopartikel beispielsweise mit einem edlen Metall wie

etwa Silber metallisiert sein. Mit einer dazu passenden Gegenelektrode aus einem unedlen Metall wie beispielsweise Zink auf einem Fleck der Schaltkreisoberfläche und einer Zugabe von etwas Silbernitrat zur Flüssigkeit bildet sich ein galvanisches Element mit einer Ruhe- spannung von etwa 1,5 Volt, wobei die Nanopartikel den positiven Pol bilden und die

- 5 Verzinkung den negativen Pol. Zinkmoleküle gehen dabei als positiv geladene Zinkionen vom Zinkflecken der Chipoberfläche in Lösung und veranlassen positiv geladene Silberionen zur Ausscheidung auf der Silberelektrode der Nanopartikel. Es fließt ein Strom positiver Ladungen vom Zink zum Silber, bis der Aufbau der vollen Spannung erreicht ist. Es ist dazu nur außerordentlich wenig Silbernitrat erforderlich, da insgesamt praktisch kein Strom fließt (nur 10 der so genannte Verschiebungsstrom).

Das Potential zwischen versilberten Nanopartikeln in der Elektrolyflüssigkeit und verzinkter Gegenelektrode auf der Chipoberfläche kann nicht direkt über induzierte Spiegelladungen auf die Schaltkreise an anderer Stelle der Chipoberfläche einwirken, da die Nanopartikel vollkommen von Ionen anderer Polarität umgeben sind und nach außen in der Flüssigkeit 15 spannungslos erscheinen.

Es ist daher erforderlich, einen elektrisch leitenden Kontakt der Nanopartikel zu ausgewählten Stellen der Schaltkreise in der Halbleiteroberfläche herzustellen, von denen aus dann ein geringer Strom zur Zinkelektrode fließen kann. Diese besonderen Stellen der Schaltkreise werden hier als „Kontaktstellen“ bezeichnet. Die Kontaktstellen haben eine bessere Leitfähigkeit als ihre Umgebung, sie sind über besonders dotierte Bahnen, die auch von Steuerelektroden unterbrochen sein können, mit den Zinkflecken verbunden. Der hier fließende Strom, der gegebenfalls wieder nur ein Verschiebungsstrom mit sehr geringer Ladungsverschiebung ist, kann zur Steuerung der Schaltkreise benutzt werden, beispielsweise über den bekannten 20 Induktionseinfluss auf die Steuergitterelektroden von Feldeffekt-Transistoren. Diese Art der Einwirkung ist sehr empfindlich, bereits ein einziges gebundenes Nanopartikel kann eine 25 messbare Wirkung erzeugen.

Die kovalente Anbindung der Haftmoleküle auf den Silberoberflächen der Nanopartikel über Thio-Verbindungen ist bekannt und braucht hier nicht beschrieben zu werden.

Die Herstellung eines elektrisch leitenden Kontaktes kann in verschiedener Weise hergestellt 30 werden: Einmal über die Verwendung von elektronenleitenden Kettenmolekülen, die auf den Kontaktstellen der Chipoberfläche angebunden sind, zum anderen durch einen direkten Berührungskontakt des Nanopartikels mit der Kontaktstelle auf der Schaltkreisoberfläche, der beispielweise durch magnetische oder mechanische Kräfte durch gegendrückende Körper 35 hergestellt werden kann. Der elektrische Kontakt mit der Schaltkreisoberfläche kann auch durch metallische Whisker oder andere elektrisch leitende Protrusionen auf der Schaltkreis- oberfläche oder auf der Nanopartikeloberfläche hergestellt werden. Elektrisch leitende

Protrusionen können auch in Verbindung mit magnetischen Feldern oder mechanischen Kräften zur Kontaktierung dienen.

Die elektronenleitenden Moleküle können in den Sondenfeldern (die dann mit den Kontaktstellen identisch sind) zwischen den Sondenmolekülen angeordnet sein, sie können sich aber

5 auch allein auf den Kontaktstellen befinden, wobei dann die Sondenfelder auf gegenüberliegenden Körperoberflächern, den Gegenflächen, liegen. Als elektrisch leitende Moleküle kommen Kettenmoleküle aus der Gruppe der Polyene in Betracht, die abwechselnd aus Einfach- und Doppelbindungen bestehen und deren  $\pi$ -Elektronenwolken sich jeweils so überlappen, dass ein Elektronenstrom längs der Molekülkette fließen kann. Sie können

10 beispielsweise aus Acethylen polymerisiert werden. Die Kettenmoleküle können, wenn sie zwischen den Sondenmolekülen an die Schaltkreisoberfläche angebunden sind, in ihrer Länge so gewählt werden, dass sie bis zu den Nanopartikeln reichen. Für einen Abstand von etwa 50 Nanometern sind etwa 300 Kettenglieder erforderlich. Ihr Aufbau erfolgt zweckmäßigerweise durch gliedweise Synthese auf der Schaltkreisoberfläche selbst.

15 Bei guter Isolierung der vielen Schaltkreise eines Chiparrays gegeneinander und guter Ausbildung der Schalkreise unter Einbeziehung der Zinkflecken und Kontaktstellen ist selbst bei Ausbildung vieler galvanischer Zellen auf dem Chiparray keine gegenseitige Beeinflussung der Schaltkreise (Übersprechen) zu gewärtigen, da die Kontaktstellen und die Zinkflecken einander zugeordnet sind und ein Spannungsaufbau an einem Schaltkreis nicht auf 20 andere Schaltkreise einwirkt, obwohl sich die ionenleitende Flüssigkeit über alle Schaltkreise gleichmäßig erstreckt.

Sollte es für eine gut separierte Messung zweckmäßig sein, die einzelnen Felder des Arrays auf der Schaltkreisoberfläche so voneinander zu trennen, so ist ebenfalls möglich. Es kann erreicht werden, dass der Elektrolyt für die Messphase keine über die Felder hinweg durchgehende Flüssigkeitsschicht mehr bildet. Das kann beispielsweise dadurch geschehen, dass die einzelnen Arrayfelder voneinander durch schmale Gräben getrennt sind, deren Wände stark hydrophobisiert sind. Bei Bedeckung des Chips mit einer reichlichen Menge wässriger Flüssigkeit bleiben diese Gräben mit Luft gefüllt und die Flüssigkeit bildet ein durchgehendes Volumen. In dieser Vollflüssigkeitsphase werden die Bindungen von Analytmolekülen, dann 30 auch die Bindungen der Nanopartikel vorgenommen. Bei Entfernung eines großen Teils der Flüssigkeit reißen die Gräben auf; es bleiben flache Flüssigkeitshügel auf den durch die Sondenmolekülbelegungen und die teilweise Verzinkung hydrophilen Arrayfeldern zurück. Befinden sich in diesen Flüssigkeitshügeln versilberte Nanopartikel, so bildet sich bei Zugabe von Silbersalzen ein galvanisches Element, in Flüssigkeitshügeln ohne Nanopartikel bildet 35 sich dagegen kein solches elektrochemisches Element.

Sind die Sondenmoleküle auf einer der Schaltkreisoberfläche gegenüberstehenden Gegenfläche angebracht, so können sich auch räumlich voneinander getrennte Flüssigkeitsfelder bilden, die sich zwischen Schaltkreisoberfläche und Gegenfläche bilden.

Die Kontaktstellen, die mit den nach Bindungsreaktionen indirekt gebundenen Nanopartikeln

- 5 über elektronenleitende Kettenmoleküle oder über direkten Kontakt in Verbindung stehen, können sich beispielsweise direkt über den Steuergitterelektroden für Feldeffekt-Transistoren befinden, während sich der verzinkte Teil der Oberfläche etwas seitab befindet. Es lädt sich dann die Kontakstelle nach Kontaktierung auf eine Spannung von etwa 1,5 Volt auf. Das Feld dieser Spannung wirkt auf die hochempfindliche Steuergitterelektrode ein und regelt den  
10 Stromfluss im Feldeffekt-Transistor. Die Polarität des galvanischen Elementes bestimmt, ob der Transistor bei Anwesenheit der Nanopartikel leitend wird oder sperrt. Möchte man einen Effekt mit umgekehrter Polarität erzeugen, so können auch die Nanopartikel mit einem unedlen Metall überzogen und die Schaltkreisoberfläche mit einem edlen Metall bedeckt sein.  
Selbstredend können für die Bildung des galvanischen Elements beliebige Paare von Metallen  
15 aus der elektrochemischen Spannungsreihe verwendet werden, die Auswahl wird aber durch die Chemie der Anbindung organischer Haftmoleküle an die Nanopartikel begrenzt.

Wie schon mehrfach betont, brauchen sich die Sondenmoleküle nicht auf der Schaltkreisoberfläche selbst zu befinden, sie können sich auch auf der Gegenfläche befinden. Auch die hier

- 20 indirekt gebundenen Nanopartikel können elektrisch auf die Schaltkreise der Schaltkreisoberfläche einwirken, entweder durch die Änderung der Umgebungskapazität, oder durch die Erzeugung einer galvanischen Spannung. Die Kontaktierung der Nanopartikel zur Schaltkreisoberfläche kann dann beispielsweise auch dadurch erfolgen, dass die gesamte Gegenfläche mit den Nanopartikeln an die Schaltkreisoberfläche angedrückt wird. Die mit Sondenmolekülen belegte Gegenfläche ist zu diesem Zweck vorzugsweise aus isolierendem Material,  
25 wie beispielsweise Glas oder Kunststoff, gefertigt. Es können die auf dieser Gegenfläche befestigten Nanopartikel oder die Analytmoleküle jedoch auch durch reversible Reaktion von ihren Affinitätspartnern gelöst werden und dann durch magnetische Kräfte durch die ruhende Flüssigkeit zu den Kontaktstellen auf der Schaltkreisoberfläche gezogen werden. Die Aufhebung der affinen Bindungen kann in bekannter Weise durch Temperaturerhöhung, durch  
30 Änderung des pH-Wertes oder durch Verdrängungsreaktionen bewirkt werden.

Es können die Kontaktstellen auf der Schaltkreisoberfläche auch mit elektronenleitenden Kettenmolekülen belegt sein, die bis zu den Nanopartikeln auf den Sondenfeldern der Gegenfläche reichen.

Im Falle des Nachweises von vorbestimmt ausgewählten DNA-Sequenzen in der Analytflüs-

- 35 sigkeit kann auch eine PCR-Reaktion für die Analytsequenzen und ihre Umgebung vorgeschaletet werden. Diese kann direkt in einer Kammer stattfinden, deren eine Wand durch die Schaltkreisoberfläche gebildet wird. Die andere Wand kann eine Wand aus Glas oder

Halbleiter sein, in die entsprechende Heizelemente für die Heizzyklen der PCR-Reaktion integriert sind. Die PCR-Reaktion kann beispielsweise im ersten Schritt von Mehrschritt-Verfahren integriert sein.

Dabei ist es beispielsweise auch möglich, in einer PCR-Reaktion die Sondensequenzen als

- 5 Primer auf der Chipoberfläche und die Haftsequenzen als Primer auf den Nanopartikeln durch die Hilfe von passenden Analytmolekülen jeweils so zu verlängern, dass sie in komplementärer Weise Strang und Gegenstrang bilden. Die Nanopartikel können dann magnetisch festgehalten werden, um die überschüssige Analytflüssigkeit mit Polymerase, Puffern und Nukleinsäuretriphosphatbausteinen zu entfernen. Anschließend wird die Hybridisierung der  
10 verlängerten Sondensequenzen auf den Nanopartikeln mit den verlängerten Haftsequenzen auf der Chipoberfläche vollzogen.

Die hier gegebenen Grundlagen der Erfindung erlauben es dem einschlägigen Fachmann, das analytische Verfahren in vielfältiger Weise zu variieren und zu verfeinern.



## Ansprüche

1. Verfahren zur Messung der Anbindung von Analytmolekülen an Sondenmoleküle, die sich in räumlicher Nähe zu einer Schaltkreisoberfläche befinden, dadurch gekennzeichnet,
- 5        dass zusammen mit den Analytmolekülen auch elektrisch leitfähige Nanopartikel an die Sondenmoleküle angebunden werden, und dass die Nanopartikel elektrisch durch Stromerzeugung oder Kapazitätsänderung auf die Schaltkreise der Schaltkreisoberfläche einwirken, wodurch die Anbindung der Analytmoleküle elektrisch messbar wird.
- 10      2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle auf Flächenstücke der Schaltkreisoberfläche gebunden sind.
- 15      3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle auf Flächenstücke einer Gegenfläche gebunden sind, die der Schaltkreisoberfläche gegenübersteht.
- 20      4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Sondenmoleküle kovalent an die Oberfläche gebunden sind, und dass die Analytmoleküle affin an die Sondenmoleküle gebunden werden.
- 25      5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Analytmoleküle bereits an Nanopartikel angebunden sind.
- 30      6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass in einem ersten Schritt gelöste Analytmoleküle an oberflächengebundene Sondenmoleküle gebunden werden, und dass in einem zweiten Schritt Nanopartikel mit auf ihnen befestigten Haftmolekülen an die gebundenen Analytmoleküle gebunden werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass in den Schaltkreisen die Veränderung der Kapazität durch die angebundenen Nanopartikel gemessen wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass durch die metallische Oberfläche der angebundenen Nanopartikel, durch eine metallische Gegenelektrode begrenzter Größe auf der Schaltkreisoberfläche und durch einen geeigneten Elektrolyten ein galvanisches Element erzeugt wird, dass durch Kontakt mit der Schaltkreisoberfläche abseits der Gegenelektrode einen Stromfluss in der Schaltkreisoberfläche zur Gegenelektrode hin erzeugt, wodurch die Anbindung von Analytmolekülen messbar wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Kontakt zwischen Nanopartikel und Schaltkreisoberfläche durch elektrisch leitende Moleküle hergestellt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den elektrisch leitenden Molekülen um Verbindungen aus der Klasse der Polyene handelt.
11. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Kontakt durch Berührung der Nanopartikel mit der Schaltkreisoberfläche hergestellt wird.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Analytmoleküle und Nanopartikel an Sondenmoleküle gebunden werden, die sich auf einer isolierenden Oberfläche gegenüber der Schaltkreisoberfläche befinden, und dass der Kontakt der Nanopartikel mit der Chipoberfläche dadurch hergestellt wird, dass die isolierende Oberfläche mit den angebundenen Nanopartikeln gegen die Schaltkreisoberfläche gedrückt wird.
13. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Analytmoleküle und magnetisierbare Nanopartikel an Sondenmoleküle gebunden werden, die sich auf einer Oberfläche gegenüber der Schaltkreisoberfläche befinden, dass die Bindungen zwischen Nanopartikeln und Analytmolekülen oder die Bindungen zwischen den Analytmolekülen und den Sondenmolekülen aufgelöst werden, und dass der Kontakt der jetzt nicht mehr gebundenen Nanopartikel mit der Schaltkreisoberfläche durch die Einwirkung eines äußeren Magnetfelds auf die Nanopartikel hergestellt wird.
- 20 14. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass Analytmoleküle und magnetisierbare Nanopartikel an Sondenmoleküle gebunden werden, die sich auf der Schaltkreisoberfläche befinden, und dass der Kontakt der Nanopartikel mit der Schaltkreisoberfläche durch die Einwirkung eines äußeren Magnetfelds oder durch mechanischen Druck eines anderen Körpers auf die Nanopartikel hergestellt wird.
- 25 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Schaltkreisoberfläche oder die Oberfläche der Nanopartikel mit elektrisch leitenden Protrusionen besetzt ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass als Sondenmoleküle DNA-Oligomere verwendet werden, dass die Analytmoleküle in einem vorhergehenden Schritt durch Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) vervielfältigt werden, wobei ein biotinylierter Primer verwendet wird, und dass die Nanopartikel durch eine Belegung mit Streptavidin an die Biotin-Gruppen der Analytmoleküle gebunden werden.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass statt des Bindungspaares Biotin-Streptavidin ein anderes Bindungspaar verwendet wird.

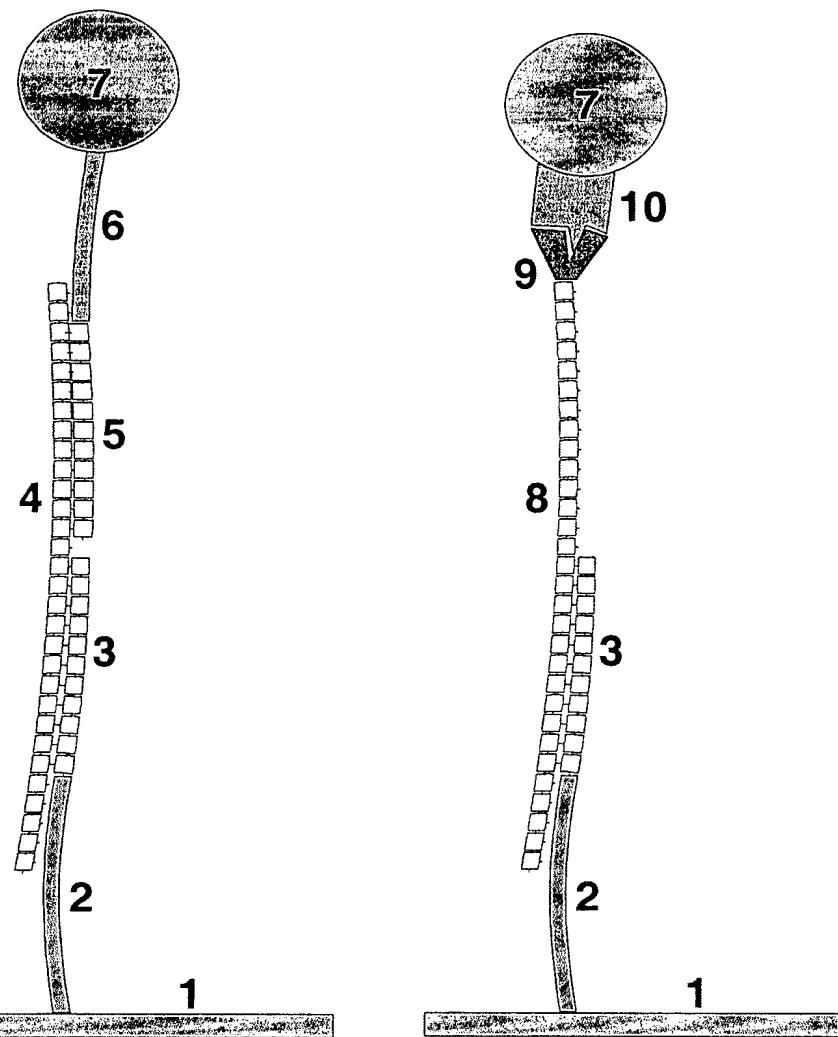


Abbildung 1

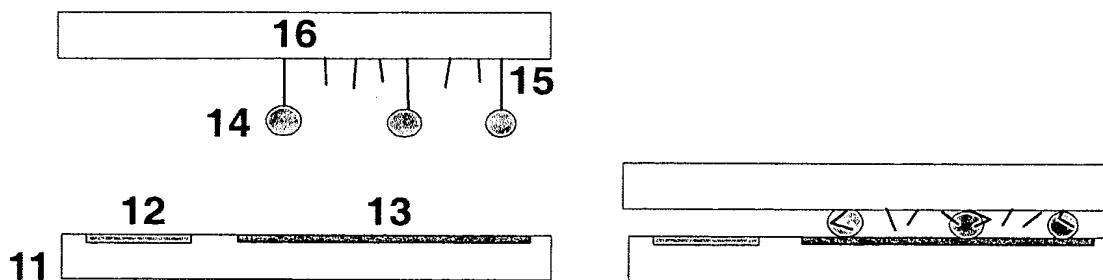


Abbildung 2

## Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf den Nachweis der Bindungen von Analytmolekülen, beispielsweise Biopolymermolekülen, an immobilisierten Fängersubstanzmolekülen.

Die Erfindung besteht darin, Halbleiter-Platten (Chips) mit elektrischen Schaltkreisen in räumlicher Nähe zur Oberflächenbelegung mit Fängersubstanzmolekülen zu verwenden, und die Bindungen der Analytmoleküle an den Fängersubstanzmolekülen durch mitgebundene elektrisch leitfähige Nanopartikel zu belasten, so dass die Nanopartikel durch Änderungen der elektrischen Umgebungskapazität oder durch Erzeugung von elektrochemischen Spannungen auf die elektrischen Schaltkreise einwirken können und somit die Bindungen der Analytmoleküle elektronisch nachweisbar werden.

Abbildung 1

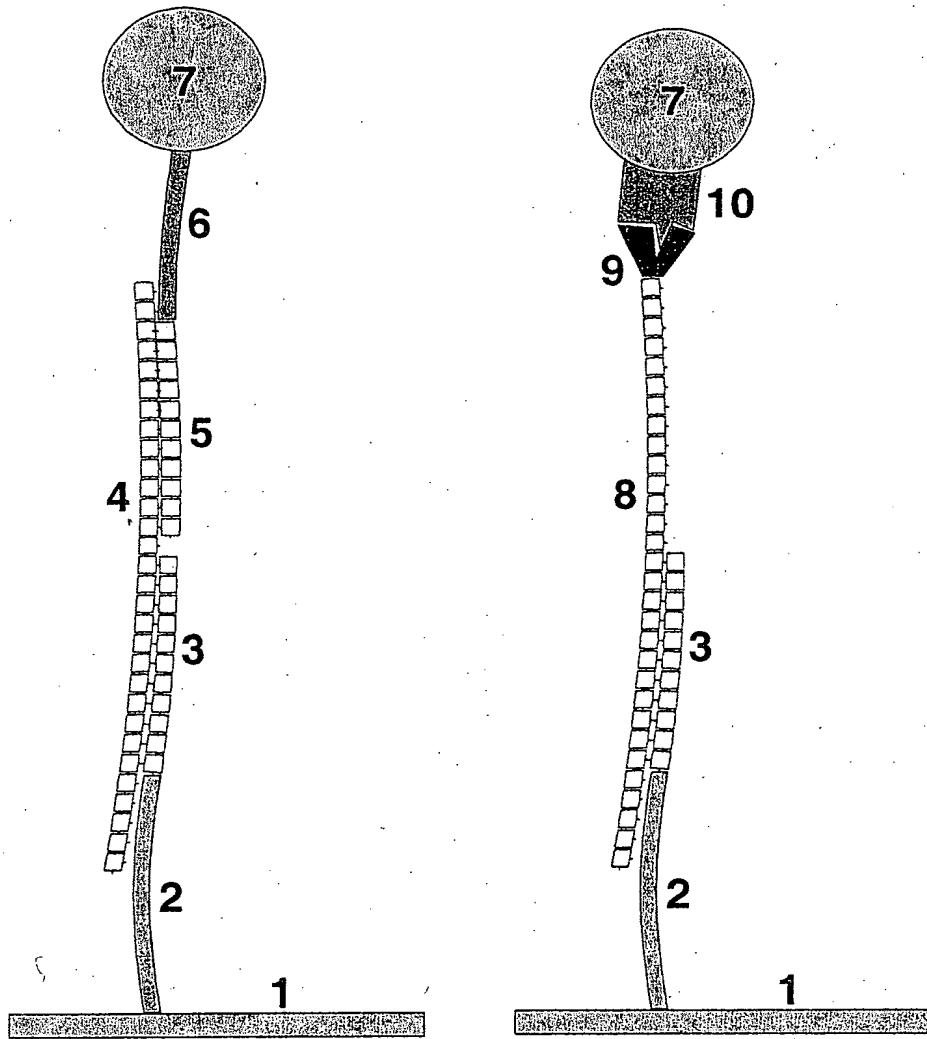


Abbildung 1